

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 15 JUIN 2003

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Important Remplir impérativement la 2ème page.

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 190600

REMISE DES PIÈCES DATE 18 JUIL 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0209099 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 18 JUIL. 2002		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE PONTET ALLANO & Associés Selarl 25 rue Jean Rostand Parc Club Orsay Université 91893 ORSAY Cedex	
Vos références pour ce dossier (facultatif) IFB02 MKT CVF			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date ____/____/____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date ____/____/____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
"Procédé et appareillage d'imagerie de fluorescence confocale fibrée."			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		MAUNA KEA TECHNOLOGIES	
Prénoms			
Forme juridique		Société par actions simplifiée	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Adresse	Rue	9 rue d'Enghein	
	Code postal et ville	75010	75010 PARIS
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE 18 JUIL 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0209099 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		IFB02 MKT CVF	
6 MANDATAIRE			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		PONTET ALLANO & Associés	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	25 rue Jean Rostand Parc Club Orsay Université	
	Code postal et ville	91893	ORSAY Cedex
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 69 33 21 21	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 69 41 95 88	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI MME BLANCANEUX	

« Procédé et appareillage d'imagerie de fluorescence confocale fibrée »

La présente invention concerne un procédé et un appareillage d'imagerie de fluorescence confocale fibrée. Le domaine d'application visé est plus particulièrement celui de l'imagerie in vivo et in situ.

La fluorescence observée peut provenir d'un composé exogène (typiquement un marqueur injecté) ou endogène (présent dans la cellule) d'un tissu biologique.

Plus particulièrement, le procédé selon l'invention est du type consistant à balayer point par point un tissu dans un plan subsurfacique, chaque point correspondant à un signal d'excitation émis par une source continue, dévié et injecté tour à tour dans une fibre optique d'un faisceau de fibres optiques, puis focalisé à la sortie de ladite fibre dans ledit plan, chaque point émettant en retour un signal de fluorescence collecté par ladite fibre optique, puis détecté et numérisé pour former un élément d'image.

Le caractère confocal est obtenu en utilisant le même chemin optique, notamment la même fibre optique servant de filtrage spatial, pour transporter le signal d'excitation et le signal de fluorescence émis en réaction.

L'appareillage correspondant comprend le faisceau de fibres optiques souples (appelé couramment guide d'image) avec, à son extrémité proximale :

- la source émettant en continu à la longueur d'onde d'excitation d'un ou plusieurs fluorophores ciblés, typiquement une source laser ;
- des moyens de balayage rapide dans le temps du faisceau d'excitation produit par la source en lignes et en colonnes dans un plan XY correspondant à la section d'entrée du guide d'image ;
- des moyens d'injection du faisceau d'excitation dans l'une des fibres optiques ;
- des moyens de détection du signal de fluorescence ; et
- des moyens de commande, notamment des moyens de balayage.

Des moyens étant en outre prévus pour permettre la réalisation et la visualisation d'une image à partir des signaux détectés successivement sur chaque fibre.

5 A l'extrémité distale du guide d'image, se trouve une tête optique, destinée à être mise en contact avec le tissu observé, permettant de focaliser le faisceau d'excitation à une profondeur donnée (quelques dizaines de μm) et donc de réaliser une image subsurfacique.

En pratique, ce type d'appareillage présente notamment les avantages suivants :

- 10 - du côté distal du guide d'image se trouve uniquement une optique de focalisation, qui est moins fragile et moins coûteuse qu'une tête optique intégrant des moyens de balayage, le remplacement de la tête optique pouvant être envisagé indépendamment des moyens de balayage ; par ailleurs la tête est miniaturisable, ce qui présente un intérêt en endoscopie
- 15 et également, d'une manière générale, pour augmenter la précision de positionnement ;
- un guide d'image fait de fibres optiques souples, sert de bras d'accès au site à observer, ce qui est important pour une application in situ.

20 Dans l'état de la technique, on a décrit les procédés et appareillages de fluorescence suivants.

Dans un article paru dans "Applied Optics", Vol.38, No. 34, décembre 1999, pages 7133-7144, est présenté un micro-endoscope confocal mettant en œuvre un faisceau de fibres optiques souples muni à son extrémité distale d'une tête optique miniature de focalisation ; il est

25 prévu de balayer le faisceau de fibres optiques en lignes, l'appareillage comprenant une fente de détection ainsi qu'un détecteur linéaire CCD de type à transfert de charges. Un appareillage de ce type permet d'obtenir 4 images/s, ce qui est trop lent pour une imagerie in situ tributaire des bougés du sujet et de l'opérateur. Par ailleurs, le fait de balayer en lignes et non

30 point par point dégrade le caractère confocal et conduit à une image moins bien résolue.

Dans un article paru dans "Optics Communications", 188 (2001), pages 267-273, est présenté le couplage d'un microscope confocal de table à balayage laser avec un faisceau de fibres optiques souples muni à son extrémité distale d'une tête optique miniature. Le but recherché est de rendre le microscope compatible avec un endoscope. Le balayage est réalisé fibre à fibre mais le microscope de table utilisé est de conception classique, conçu pour visualiser un échantillon fixe sans soucis du temps d'obtention d'une image. Un temps de pose de 2 secondes est avancé dans cet article, beaucoup trop long pour une imagerie in situ, en temps réel.

La présente invention a pour but de proposer un procédé et un appareillage d'imagerie de fluorescence confocale fibrée, du type utilisant un guide d'image fait de fibres optiques balayées une à une par un faisceau d'excitation émis en continu, lesdits procédé et appareillage permettant la visualisation en temps réel d'un site in vivo in situ, c'est-à-dire capable de fournir un nombre suffisant d'images point à point par seconde sans être tributaire des bougés du sujet et du praticien pour permettre notamment un examen assez rapide.

La présente invention a également pour objet de proposer un procédé et un appareillage qui, d'une manière générale, optimisent la qualité de chaque image afin notamment d'obtenir une excellente résolution latérale et axiale.

Elle propose un procédé pour réaliser une image confocale de fluorescence in vivo in situ, le procédé utilisant un guide d'image fait de plusieurs milliers de fibres optiques et consistant à balayer point par point un tissu dans un plan subsurfacique, chaque point correspondant à un signal d'excitation émis par une source continue, dévié et injecté dans l'une des fibres optiques dudit faisceau puis focalisé à la sortie de ladite fibre dans ledit plan, chaque point émettant en retour un signal de fluorescence collecté par ladite fibre optique, puis détecté et numérisé pour former un élément d'image, caractérisé en ce que l'on dévie le signal d'excitation à une vitesse correspondant à l'acquisition d'un nombre d'images par seconde suffisant pour une utilisation en temps réel et en ce que l'on détecte le

signal de fluorescence à une fréquence de détection correspondant à une fréquence minimale d'échantillonnage des fibres une à une.

Le respect de l'échantillonnage des fibres (selon le critère de Shannon) permet d'obtenir une image point à point correspondant bien à
5 chaque fibre. Cela permet de ne pas perdre d'information en échantillonnant l'ensemble des fibres une à une tout en respectant un nombre moyen minimal d'images par seconde, à savoir en pratique au minimum 12 images par secondes pour un mode maximal de 640 x 640 pixels. Le choix de la fréquence de détection (bande passante du détecteur) en fonction de cet
10 échantillonnage minimal permet ensuite pour chaque fibre de détecter le plus grand nombre possible de photons de fluorescence.

Ainsi, selon un mode de réalisation possible, mettant en œuvre un guide d'image d'environ 30 000 fibres optiques souples, la fréquence d'échantillonnage et la bande passante du système de détection (une
15 photodiode à avalanche ou équivalent) sont fixés sensiblement à 1,5 MHz, correspondant environ à 12 pixels par fibre, permettant alors d'obtenir au minimum les 12 images/s en mode maximal 640 x 640 pixels.

En pratique, selon un mode de réalisation avantageux, permettant un balayage rapide approprié des fibres pour obtenir une image en temps réel,
20 la déviation du faisceau est réglée en déterminant une fréquence de résonance rapide d'un miroir résonnant « ligne » et une fréquence de résonance lente d'un miroir galvanométrique « trame ».

Selon l'invention, la durée de détection d'un flux en provenance d'une fibre est limitée dans le temps et très courte pour respecter l'acquisition
25 d'une image en temps réel. Selon l'invention, on a donc en outre prévu des moyens d'optimisation pour collecter et détecter le maximum de flux en provenance de l'échantillon pendant cette durée de détection limitée, notamment :

- on utilise des moyens optiques de déviation, d'injection, de
30 focalisation et de détection présentant un degré d'achromaticité dépendant de l'écart en longueur d'onde entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde maximale de fluorescence, ainsi que de la largeur spectrale

du signal de fluorescence émis ; cela permet avantageusement d'optimiser le flux de fluorescence collecté sur toute la bande spectrale de fluorescence émise ;

5 - on choisit une ouverture numérique de l'optique de focalisation sur le tissu comprise sensiblement entre 0,5 et 1, permettant d'obtenir un bon compromis entre la taille de champ et la quantité de photons collectée ; et

 - on choisit un détecteur ayant une efficacité quantique aux longueurs d'ondes de fluorescence à détecter d'au moins 50%.

10 Selon l'invention, le traitement d'image réalisé ensuite sur le flux détecté est également optimisé, pour obtenir une image de très bonne qualité à partir de ce flux limité de photons détecté. Cette optimisation est réalisée de la manière suivante.

 Une série d'étapes est réalisée préalablement à l'acquisition d'images en temps réel :

- 15 - une étape de détection de l'emplacement de chaque fibre d'un ensemble choisi de fibres destinés à être utilisés (soit l'ensemble du guide d'image soit un sous-ensemble choisi) ; cette étape est à réaliser au moins à chaque changement de guide d'image ;
- 20 - une étape de calibration du taux d'injection dans chaque fibre, c'est à dire de définition d'un taux d'injection propre à chaque fibre ; et
- une étape de détection de l'image de fond (sans échantillon).

 En fonctionnement, l'optimisation du traitement d'image comprend notamment les étapes consistant, après numérisation du signal détecté :

- 25 - à définir le flux réel collecté par chaque fibre c'est-à-dire ne provenant que de l'échantillon, après correction en fonction du taux d'injection propre de la fibre et de la soustraction de l'image du fond, de manière à obtenir un signal corrigé;
- 30 - puis à effectuer une reconstruction de l'image à partir de ce signal corrigé, avec pour but notamment de transformer une image présentant une mosaïque de fibres en une image sans fibres apparentes.

Selon l'invention, ces deux dernières étapes doivent être réalisables en temps réel. Pour ce qui est de la correction du signal, celle-ci peut se faire en temps réel grâce à un traitement adapté à la structure du signal observé et un algorithme optimisé. Pour ce qui est de la reconstruction de

5 l'image, elle peut se faire grâce au choix d'un nombre d'opérations par pixel réalisables en temps réel permettant d'obtenir le résultat recherché en terme de qualité d'image. Un filtrage passe-bas Gaussien représente un bon compromis entre la complexité du traitement, la qualité du résultat et le temps de calcul.

10 Pour gagner du temps et augmenter la complexité du traitement correspondant à la reconstruction de l'image, on peut aussi augmenter la capacité de traitement du matériel, par exemple en utilisant une carte de traitement spécifique et/ou une architecture parallèle comme un multiprocesseur.

15 La présente invention propose également un appareillage permettant la mise en œuvre du procédé défini ci-dessus, comprenant :

- le guide d'image ;
 - la source émettant en continu à la longueur d'onde d'excitation d'au moins un fluorophore ciblé,
 - 20 - des moyens de balayage rapide et d'injection fibre à fibre dans le temps du faisceau d'excitation produit par la source en lignes et en colonnes dans un plan XY correspondant à la section d'entrée du guide d'image ;
 - des moyens de séparation de la longueur d'onde d'excitation et des longueurs d'onde de fluorescence ;
 - 25 - des moyens de détection du signal de fluorescence ; et
 - des moyens de traitement du signal détecté permettant la réalisation d'une image ;
- à l'extrémité distale étant ménagée une tête optique, destinée à être mise en contact avec le tissu observé, permettant de focaliser le faisceau
- 30 d'excitation.

L'appareillage est caractérisé en ce que :

- les moyens de balayage sont adaptés à déplacer le faisceau d'excitation à une vitesse correspondant à l'obtention d'une image en temps réel ; et

5 - les moyens de détection présentent une bande passante dont la fréquence est fixée en fonction de la fréquence minimale d'échantillonnage des fibres une à une.

La présente invention sera mieux comprise et d'autres avantages apparaîtront à la lumière de la description qui va suivre d'un exemple de réalisation, description faite en référence aux dessins annexés sur lesquels :

10 - la figure 1 représente schématiquement ledit exemple choisi de réalisation ; et

- la figure 2 est un schéma fonctionnel de l'appareillage selon l'invention.

Selon l'exemple choisi et représenté sur les figures 1 et 2, l'appareillage comporte :

- 15 - une source lumineuse 1 ;
- des moyens 2 de mise en forme du faisceau d'excitation ;
- des moyens 3 de séparation de longueurs d'onde ;
- des moyens 4 de balayage ;
- des moyens 5 d'injection de faisceau ;
- 20 - un guide d'image 6 constitué de fibres optiques souples ;
- une tête optique de focalisation 7 ;
- des moyens 8 de réjection du faisceau d'excitation ;
- des moyens 9 de focalisation du signal de fluorescence ;
- des moyens 10 de filtrage spatial du signal de fluorescence ;
- 25 - des moyens 11 de détection du signal de fluorescence ; et
- des moyens 12 de traitement électronique et informatique du signal de fluorescence détecté et de visualisation.

Ces différents éléments sont détaillés ci-après.

30 La source lumineuse 1 est un laser émettant à une longueur d'onde d'excitation permettant d'exciter une grande gamme de fluorophores, par exemple 488 nm. Pour optimiser l'injection dans l'une des fibres du guide d'image 6, le faisceau d'excitation est circulaire pour pouvoir injecter une

fibre de section également circulaire et, pour optimiser le taux d'injection, le laser est de préférence monomode longitudinal pour présenter le meilleur front d'onde possible pour l'injection dans une fibre optique faiblement multimode. Le laser émet de manière continue et stable (bruit le plus faible possible, $<1\%$). La puissance en sortie disponible est de l'ordre de 20mW. A titre d'exemples, on peut utiliser un laser à puits quantiques (VCSEL), un laser solide pompé par diode, une diode laser ou encore un laser à gaz tel que l'Argon.

En sortie de la source 1, sont placés les moyens 2 de mise en forme du faisceau laser d'excitation. Ils sont constitués d'un système optique afocal de grandissement différent de 1, composé de deux lentilles L1 et L2 qui permettent de modifier le diamètre du faisceau laser. Le grandissement est calculé de sorte que le diamètre du faisceau soit adapté aux moyens d'injection 5 dans une fibre.

Le faisceau laser d'excitation remis en forme est ensuite dirigé vers les moyens 3 prévus pour séparer les longueurs d'ondes d'excitation et de fluorescence. Il s'agit par exemple d'un filtre dichroïque ayant une efficacité de transmission de 98 à 99 % de la longueur d'onde d'excitation et qui réfléchit donc sensiblement les autres longueurs d'onde. Le signal de fluorescence, empruntant au retour le même chemin optique que le signal d'excitation (caractère confocal), sera ainsi envoyé pratiquement totalement vers la voie de détection (8-11). Les moyens de réjection 8 placés sur la voie de détection servent à éliminer totalement les 1 à 2 % de réflexions parasites à la longueur d'onde d'excitation 488 nm qui passent vers la voie de détection (par exemple un filtre de réjection à 488 nm ou un filtre passe bande ne permettant par exemple qu'une transmission entre 500 et 600 nm).

Les moyens de balayage 4 reprennent ensuite le faisceau d'excitation. Selon l'exemple choisi et représenté sur la figure 1, ces moyens comprennent un miroir M1 résonant à 4 KHz servant à dévier le faisceau horizontalement et donc à réaliser les lignes de l'image, d'un miroir M2 galvanométrique à 15 Hz servant à dévier le faisceau verticalement et donc

à réaliser la trame de l'image ; et de deux systèmes afocaux de grandissement unitaire, AF1 situé entre les deux miroirs et AF2 situé après le miroir M2, ces systèmes afocaux étant utilisés pour conjuguer les plans de rotation des deux miroirs M1 et M2 avec le plan d'injection dans l'une
5 des fibres. Selon l'invention, la vitesse de balayage est déterminée pour permettre une observation des tissus in vivo in situ. Pour cela, le balayage doit être suffisamment rapide pour qu'il y ait au moins 12 images / s affichées à l'écran pour un mode d'affichage de 640 x 640 pixels correspondant au mode le plus lent. Pour les modes d'affichage ayant moins
10 de pixels, le nombre d'images acquises par seconde sera ainsi toujours supérieur à 12 images / s. En variante, les moyens de balayage peuvent comprendre notamment un miroir rotatif, des composants intégrés de type MEMs (miroirs de balayage X et Y), ou un système acousto-optique.

Le faisceau d'excitation dévié en sortie des moyens de balayage est
15 dirigé vers les moyens optiques 5 afin d'être injecté dans l'une des fibres du guide d'image 6. Ces moyens 5 sont constitués ici de deux ensembles optiques E1 et E2. Le premier ensemble optique E1 permet de corriger en partie les aberrations optiques en bord de champ des moyens de balayage 4, l'injection étant ainsi optimisée sur l'ensemble du champ optique (au
20 centre comme au bord). Le second ensemble optique E2 est destiné à réaliser l'injection proprement dite. Sa focale et son ouverture numérique ont été choisies pour optimiser le taux d'injection dans les fibres optiques du guide 6. Selon un mode de réalisation permettant d'obtenir le critère d'achromaticité, le premier ensemble E1 est constitué d'un doublet de
25 lentilles, et le second ensemble E2 de deux doublets de lentilles suivi d'une lentille située près du guide d'image. En variante, cette optique d'injection pourrait être constituée de tout autre type d'optiques standards, comme par exemple deux triplets, ou de lentilles à gradient d'indice ou bien d'un objectif de microscope (toutefois plus coûteux).

30 Le guide d'image 6 est constitué d'un très grand nombre de fibres optiques souples (quelques dizaines de milliers), par exemple

30 000 fibres de $2\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre et espacées de $3,3\text{ }\mu\text{m}$. En pratique, on peut utiliser soit l'ensemble des fibres du guide d'image, soit un sous-ensemble choisi de ces fibres, par exemple centré.

En sortie de la fibre optique, le faisceau laser d'excitation est focalisé
5 par la tête optique 7 dans l'échantillon 13 en un point 14 situé à une
profondeur donnée située entre quelques dizaines de μm et une centaine de
 μm , par rapport à la surface 15 de l'échantillon au contact de laquelle est
destinée à être placée la tête optique. Cette profondeur peut être par
exemple de $40\text{ }\mu\text{m}$. La tête optique permet donc de focaliser le flux sortant
10 du guide d'image dans l'échantillon, mais également de collecter le flux de
fluorescence revenant de l'échantillon. La tête optique possède un
grandissement de 2,4 et une ouverture numérique sur l'échantillon de 0,5.
Ces deux paramètres sont choisis afin que le signal de retour se fasse
uniquement dans la fibre optique ayant transmis le signal d'excitation et non
15 pas dans des fibres adjacentes et conserver ainsi le filtrage confocal à l'aide
d'une fibre. Avec ces valeurs de grandissement et d'ouverture numérique, la
résolution axiale est de l'ordre de $10\text{ }\mu\text{m}$ et la résolution latérale de l'ordre
de $1,4\text{ }\mu\text{m}$. L'ouverture numérique est également choisie de manière à
optimiser le nombre de photons récupérés qui doit être le plus important
20 possible. La tête optique peut être constituée d'optiques classiques
(doublet, triplet, asphérique) et/ou de lentilles à gradient d'indice (GRIN)
présentant une qualité optique et un chromatisme adaptés à la confocalité,
c'est à dire minimisant les aberrations optiques, qui entraîneraient sinon
notamment des dégradations sur la profondeur de champ et par conséquent
25 sur la résolution axiale de l'appareillage. En fonctionnement, la tête optique
est destinée à être posée au contact de l'échantillon 13. Ce dernier est un
tissu biologique ou une culture cellulaire. L'expression de la fluorescence est
réalisée soit par un fluorophore que l'on injecte (fluorescence systémique),
soit par un fluorophore fabriqué par la cellule elle même par modification
30 d'un gène (fluorescence transgénique). Dans ces deux cas, le fluorophore
re-émet des photons sur une bande spectrale plus ou moins grande pouvant
aller d'une dizaine de nanomètres à plus d'une centaine de nanomètres.

Sur la voie de détection, le signal de fluorescence, en sortie du filtre de réjection 8, est ensuite focalisé par les moyens 9, constitués par exemple d'une lentille de détection, dans un trou de filtrage des moyens 10 de filtrage spatial. La focale de la lentille de détection est calculée pour que le signal de fluorescence provenant d'une fibre soit de la taille ou légèrement inférieure à celle du trou de filtrage. Ce dernier permet de conserver la lumière de fluorescence ne provenant que de la fibre illuminée par le faisceau incident. Il permet de rejeter la lumière qui aurait pu être couplée dans les fibres adjacentes à celle qui est illuminée. La taille du trou est calculée pour que l'image d'une fibre s'y inscrive parfaitement. Ici, elle est de 20 μm . Par ailleurs, toujours dans un souci d'optimiser la quantité de photons traversant le trou de filtrage, et donc le flux détecté, les moyens de balayage 4, les moyens d'injection 5, les moyens de focalisation 7 de la tête optique, et les moyens de détection 8, 9 et 10 sont adaptés au fluorophore détecté : ces moyens sont choisis pour être suffisamment achromatiques pour collecter des photons sur la bande la plus large d'émission du fluorophore.

Les moyens de détection 11 ont une sensibilité maximale aux longueurs d'onde de fluorescence étudiées. On peut utiliser par exemple une photodiode à avalanches (APD) ou bien un photomultiplicateur. Par ailleurs, selon l'invention, la bande passante est choisie pour optimiser le temps d'intégration du signal de fluorescence. Elle est de 1,5 MHz, ce qui correspond à la fréquence d'échantillonnage minimale du guide d'image avec un temps d'intégration optimisé sur chaque pixel.

Les moyens électroniques et informatiques 12 de commande, d'analyse et de traitement numérique du signal détecté et de visualisation comprennent les cartes suivantes:

- une carte de synchronisation 20 qui a pour fonctions :

- de commander de manière synchronisée le balayage, c'est-à-dire le mouvement des miroirs ligne M1 et trame M2 ;
 - de connaître à tout instant la position du spot laser ainsi balayé ;
- et

- de gérer toutes les autres cartes par l'intermédiaire d'un micro-contrôleur lui-même pouvant être piloté ;
- une carte détecteur 21 qui comprend un circuit analogique qui réalise notamment une adaptation d'impédance, un convertisseur analogique numérique puis un composant logique programmable (par exemple un circuit FPGA) qui met en forme le signal ;
- une carte d'acquisition numérique 22 qui permet de traiter un flot de données numériques à fréquence variable et de l'afficher sur un écran 23 ;
- une carte graphique 24.

10 En variante, on peut utiliser une seule carte regroupant les fonctionnalités de ces différentes cartes.

Le traitement d'image se fait de la manière suivante.

15 A la mise en place d'un guide d'image dans l'appareillage, une première opération est effectuée pour reconnaître le motif des fibres dans le guide d'image, et donc connaître l'emplacement réel de chaque fibre destinée à être utilisée.

Les opérations suivantes sont également réalisées préalablement à l'utilisation de l'appareillage :

- la détermination du taux d'injection propre à chaque fibre, à l'aide d'un échantillon homogène, ce taux d'injection pouvant varier d'une fibre à une autre ; et
- la mesure de l'image de fond, effectuée sans échantillon.

25 Ces deux opérations peuvent être réalisées régulièrement en fonction de la fréquence d'utilisation de l'appareillage. Les résultats obtenus vont être utilisés pour corriger en fonctionnement le signal numérique en sortie de la carte détecteur.

En fonctionnement, selon l'invention 2 groupes de traitements sont effectués sur le signal numérique en sortie de la carte détecteur :

30 Le premier groupe consiste dans un premier temps à corriger le signal numérique notamment pour tenir compte du taux propre réel d'injection de la fibre dont est issu ledit signal et pour lui soustraire la partie du flux correspondant à l'image de fond. Cela permet de ne traiter qu'un signal

correspondant réellement à l'échantillon observé. On utilise pour ce groupe de traitement un algorithme de calcul classique qui est optimisable pour respecter la contrainte du temps réel.

Le second groupe consiste ensuite, à partir du signal corrigé, à
5 reconstruire l'image numérique qui sera visualisée par le praticien. Le but du traitement effectué est d'offrir à la visualisation une image numérique reconstituée qui ne soit pas simplement une mosaïque d'éléments d'image correspondant chacun à un signal numérique corrigé d'une fibre mis côte à
côte, mais d'offrir une image numérique reconstituée qui ne fasse plus
10 apparaître les fibres. On utilise pour cela un algorithme destiné à effectuer un certain nombre d'opérations sur chaque pixel, l'algorithme étant choisi pour respecter la contrainte de temps réel, c'est à dire qu'il doit représenter un bon compromis entre la complexité des opérations demandées, la qualité du résultat que l'on peut obtenir et le temps de calcul. A titre d'exemple, on
15 peut utiliser un algorithme de filtrage passe-bas Gaussien.

Le fonctionnement de l'appareillage est le suivant. La source 1 produit un faisceau parallèle circulaire d'excitation à $\lambda = 488 \text{ nm}$, qui est ensuite remis en forme dans le système afocal 2 afin de lui donner la taille adéquate pour la meilleure injection possible dans le cœur d'une fibre. Ce
20 faisceau est ensuite envoyé vers le système de séparation dichroïque 3 qui réfléchit la longueur d'onde d'excitation. Le faisceau incident est ensuite dévié angulairement dans le temps dans les deux directions de l'espace par le système de balayage optomécanique de miroirs 4, et injecté grâce aux moyens optiques d'injection 5 dans l'une des fibres du guide d'image 6. Les
25 moyens électroniques 12 servent à commander l'injection à un instant donné de l'une des fibres optiques du guide d'image en déviant angulairement le faisceau au moyen des miroirs, et ce point par point pour une ligne donnée, et ligne après ligne, pour constituer l'image. En sortie du guide, la lumière émergeant de la fibre injectée est focalisée dans
30 l'échantillon grâce à la tête optique 7 en un point situé à une profondeur donnée située sensiblement entre quelques dizaines de μm et une centaine de μm . Grâce au balayage, l'échantillon est illuminé point par point. A

chaque instant, le spot illuminant le tissu émet alors un signal de fluorescence qui a la particularité d'être décalé vers des plus grandes longueurs d'onde. Ce signal de fluorescence est capté par la tête optique 7, puis suit le chemin inverse du faisceau d'excitation jusqu'au filtre dichroïque 5 3 qui va transmettre le signal de fluorescence vers la voie de détection. Les réflexions parasites se produisant à la longueur d'onde d'excitation vont ensuite être rejetées par le filtre de réjection 8. Enfin, le signal de fluorescence est focalisé dans le trou de filtrage 10 pour ne sélectionner que la lumière provenant de la fibre excitée et les photons sont détectés par la 10 photodiode à avalanche 11. Le signal détecté est ensuite numérisé et corrigé. Les signaux détectés, les uns après les autres, sont traités en temps réel grâce au traitement d'image décrit plus haut pour permettre la reconstruction d'une image en temps réel visualisée à l'écran.

Revendications

1. Procédé pour réaliser une image confocale de fluorescence in vivo in situ, le procédé utilisant un guide d'image fait de plusieurs milliers de fibres optiques et consistant à balayer point par point un tissu dans un plan subsurfacique, chaque point correspondant à un signal d'excitation émis par une source continue, dévié et injecté dans l'une des fibres optiques dudit faisceau puis focalisé à la sortie de ladite fibre dans ledit plan, chaque point émettant en retour un signal de fluorescence collecté par ladite fibre optique, puis détecté et numérisé pour former un élément d'image, caractérisé en ce que l'on dévie le signal d'excitation à une vitesse correspondant à l'acquisition d'un nombre d'images par seconde suffisant pour une utilisation en temps réel et en ce que l'on détecte le signal de fluorescence à une fréquence de détection correspondant à une fréquence minimale d'échantillonnage des fibres une à une.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on règle une vitesse de déviation du faisceau d'excitation en déterminant une fréquence de résonance rapide d'un miroir résonnant ligne et une fréquence de résonance lente d'un miroir galvanométrique trame.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'on utilise des moyens optiques de déviation, d'injection, de focalisation et de détection présentant un degré d'achromaticité permettant de collecter des photons sur toute la largeur de la bande d'émission du fluorophore excité.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé par une efficacité quantique de la détection aux longueurs d'ondes de fluorescence à détecter d'au moins 50%.
5. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par une ouverture numérique de l'optique de focalisation comprise sensiblement entre 0,5 et 1.

Revendications

1. Procédé pour réaliser une image confocale de fluorescence in vivo in situ, le procédé utilisant un guide d'image fait de plusieurs milliers de fibres optiques et consistant à balayer point par point un tissu dans un plan subsurfacique, chaque point correspondant à un signal d'excitation émis par une source continue, dévié et injecté dans l'une des fibres optiques dudit faisceau puis focalisé à la sortie de ladite fibre dans ledit plan, chaque point émettant en retour un signal de fluorescence collecté par ladite fibre optique, puis détecté et numérisé pour former un élément d'image, caractérisé en ce que l'on dévie le signal d'excitation à une vitesse correspondant à l'acquisition d'un nombre d'images par seconde suffisant pour une utilisation en temps réel et en ce que l'on détecte le signal de fluorescence à une fréquence de détection correspondant à une fréquence minimale d'échantillonnage des fibres une à une.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on règle une vitesse de déviation du faisceau d'excitation en déterminant une fréquence de résonance rapide d'un miroir résonnant ligne et une fréquence de résonance lente d'un miroir galvanométrique trame.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'on utilise des moyens optiques de déviation, d'injection, de focalisation et de détection présentant un degré d'achromaticité permettant de collecter des photons sur toute la largeur de la bande d'émission du fluorophore excité.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé par une efficacité quantique de la détection aux longueurs d'ondes de fluorescence à détecter d'au moins 50%.
5. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par une ouverture numérique de l'optique de focalisation comprise sensiblement entre 0,5 et 1.

6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par une étape préalable de détection de l'emplacement des fibres du guide d'image destinées à être utilisées.
7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par une étape préalable de détermination du taux réel d'injection propre à chaque fibre.
8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par une étape préalable de détermination du flux collecté correspondant à l'image de fond.
9. Procédé selon les revendications 7 et 8, caractérisé par une étape de correction du signal numérisé en provenance d'une fibre par soustraction du flux correspondant à l'image de fond et adaptation au taux réel d'injection propre de ladite fibre.
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé par une étape de reconstruction de l'image à partir du signal corrigé.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'étape de reconstruction d'image comprend un filtrage passe-bas Gaussien.
12. Appareillage d'imagerie de fluorescence confocale fibrée in vivo in situ pour la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications précédentes, comprenant :
 - le guide d'image (6) ;
 - la source (1) émettant en continu à la longueur d'onde d'excitation d'au moins un fluorophore ciblé,
 - des moyens de balayage rapide (4) et d'injection (5) fibre à fibre dans le temps du faisceau d'excitation produit par la source (1) en lignes et en colonnes dans un plan XY correspondant à la section d'entrée du guide d'image (6);
 - des moyens (3) de séparation de la longueur d'onde d'excitation et des longueurs d'onde de fluorescence ;
 - des moyens de détection (11) du signal de fluorescence ; et

6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par une étape préalable de détection de l'emplacement des fibres du guide d'image destinées à être utilisées.
7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par une étape préalable de détermination du taux réel d'injection propre à chaque fibre.
8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé par une étape préalable de détermination du flux collecté correspondant à l'image de fond.
9. Procédé selon les revendications 7 et 8, caractérisé par une étape de correction du signal numérisé en provenance d'une fibre par soustraction du flux correspondant à l'image de fond et adaptation au taux réel d'injection propre de ladite fibre.
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé par une étape de reconstruction de l'image à partir du signal corrigé.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'étape de reconstruction d'image comprend un filtrage passe-bas Gaussien.
12. Appareillage d'imagerie de fluorescence confocale fibrée in vivo in situ pour la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications précédentes, comprenant :
- le guide d'image (6) ;
 - la source (1) émettant en continu à la longueur d'onde d'excitation d'au moins un fluorophore ciblé,
 - des moyens de balayage rapide (4) et d'injection (5) fibre à fibre dans le temps du faisceau d'excitation produit par la source (1) en lignes et en colonnes dans un plan XY correspondant à la section d'entrée du guide d'image (6);
 - des moyens (3) de séparation de la longueur d'onde d'excitation et des longueurs d'onde de fluorescence ;
 - des moyens de détection (11) du signal de fluorescence ; et

- des moyens (12) de traitement du signal détecté permettant la réalisation d'une image ;

à l'extrémité distale étant ménagée une tête optique (7), destinée à être mise en contact avec le tissu observé (13), permettant de focaliser le

5 faisceau d'excitation,

caractérisé en ce que :

- les moyens de balayage sont adaptés à déplacer le faisceau d'excitation à une vitesse correspondant à l'obtention d'une image en temps réel ; et

10 - les moyens de détection présentent une bande passante dont la fréquence est fixée en fonction de la fréquence minimale d'échantillonnage des fibres une à une.

13. Appareillage selon la revendication 12, caractérisé en ce que le faisceau d'excitation produit par la source (1) est monomode longitudinal
15 présentant une qualité de front d'onde optimale pour l'injection dans une fibre optique faiblement multimode.

14. Appareillage selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que la section d'une fibre étant circulaire, le faisceau d'excitation produit par la source est circulaire de manière à optimiser l'injection dans une fibre.

20 15. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé par des moyens (2) de mise en forme du faisceau utilisés en sortie de la source (1) pour mettre en forme le faisceau d'excitation afin de l'adapter aux moyens d'injection (5) dans la guide d'image (6).

25 16. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce que les moyens pour séparer les longueurs d'onde d'excitation et de fluorescence comprennent un filtre dichroïque (3) ayant un maximum d'efficacité à la longueur d'onde d'excitation.

16. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé par des moyens de réjection (8) placé en amont des moyens de détection (11)
30 et adaptés à éliminer la longueur d'onde d'excitation.

17. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 17, caractérisé en ce que les moyens de balayage (4) comprennent un miroir ligne résonnant

- des moyens (12) de traitement du signal détecté permettant la réalisation d'une image ;

à l'extrémité distale étant ménagée une tête optique (7), destinée à être mise en contact avec le tissu observé (13), permettant de focaliser le

5 faisceau d'excitation,

caractérisé en ce que :

- les moyens de balayage sont adaptés à déplacer le faisceau d'excitation à une vitesse correspondant à l'obtention d'une image en temps réel ; et

10 - les moyens de détection présentent une bande passante dont la fréquence est fixée en fonction de la fréquence minimale d'échantillonnage des fibres une à une.

13. Appareillage selon la revendication 12, caractérisé en ce que le faisceau d'excitation produit par la source (1) est monomode longitudinal
15 présentant une qualité de front d'onde optimale pour l'injection dans une fibre optique faiblement multimode.

14. Appareillage selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que la section d'une fibre étant circulaire, le faisceau d'excitation produit par la source est circulaire de manière à optimiser l'injection dans une fibre.

20 15. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé par des moyens (2) de mise en forme du faisceau utilisés en sortie de la source (1) pour mettre en forme le faisceau d'excitation afin de l'adapter aux moyens d'injection (5) dans la guide d'image (6).

25 16. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisé en ce que les moyens pour séparer les longueurs d'onde d'excitation et de fluorescence comprennent un filtre dichroïque (3) ayant un maximum d'efficacité à la longueur d'onde d'excitation.

17. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisé par des moyens de réjection (8) placé en amont des moyens de détection (11)
30 et adaptés à éliminer la longueur d'onde d'excitation.

18. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 17, caractérisé en ce que les moyens de balayage (4) comprennent un miroir ligne résonnant

(M1), un miroir galvanométrique trame (M2), un premier système optique afocal de grandissement unitaire (AF1) permettant de conjuguer les deux miroirs et un second système afocal (AF2) de grandissement unitaire permettant de conjuguer les plans de rotation des deux miroirs avec le plan d'injection dans l'une des fibres.

5 18. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 17, caractérisé en ce que les moyens optiques de la tête optique (7), les moyens de balayage (4), les moyens d'injection (5) et les moyens de détection présentent un degré d'achromatisation permettant de collecter des photons sur toute la largeur
10 de la bande spectrale du signal de fluorescence.

15 19. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 18, caractérisé en ce que les moyens d'injection (5) comprennent deux ensembles optiques (E1,E2), le premier ensemble (E1) étant adapté à corriger les aberrations optiques en bordure de champ des moyens de balayage (4) et le second ensemble (E2) étant adapté à réaliser l'injection proprement dite dans l'une des fibres du guide d'image (6).

20. Appareillage selon la revendication 19, caractérisé en ce que le premier ensemble optique (E1) comprend un doublet et le second ensemble optique (E2) comprend deux doublets suivi d'une lentille.

20 21. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 20, caractérisé par un trou de filtrage (10) placé avant les moyens de détection (11) dont le diamètre est choisi pour que l'image d'une fibre s'y inscrive.

22. Appareillage selon la revendication 21, caractérisé par des moyens de focalisation (9) du signal de fluorescence sur le trou de filtrage (10).

- (M1), un miroir galvanométrique trame (M2), un premier système optique afocal de grandissement unitaire (AF1) permettant de conjuguer les deux miroirs et un second système afocal (AF2) de grandissement unitaire permettant de conjuguer les plans de rotation des deux miroirs avec le plan d'injection dans l'une des fibres.
- 5 19. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 17, caractérisé en ce que les moyens optiques de la tête optique (7), les moyens de balayage (4), les moyens d'injection (5) et les moyens de détection présentent un degré d'achromatisation permettant de collecter des photons sur toute la largeur
- 10 de la bande spectrale du signal de fluorescence.
20. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 18, caractérisé en ce que les moyens d'injection (5) comprennent deux ensembles optiques (E1,E2), le premier ensemble (E1) étant adapté à corriger les aberrations optiques en bordure de champ des moyens de balayage (4) et le second
- 15 ensemble (E2) étant adapté à réaliser l'injection proprement dite dans l'une des fibres du guide d'image (6).
21. Appareillage selon la revendication 19, caractérisé en ce que le premier ensemble optique (E1) comprend un doublet et le second ensemble optique (E2) comprend deux doublets suivi d'une lentille.
- 20 22. Appareillage selon l'une des revendications 12 à 20, caractérisé par un trou de filtrage (10) placé avant les moyens de détection (11) dont le diamètre est choisi pour que l'image d'une fibre s'y inscrive.
23. Appareillage selon la revendication 21, caractérisé par des moyens de focalisation (9) du signal de fluorescence sur le trou de filtrage (10).

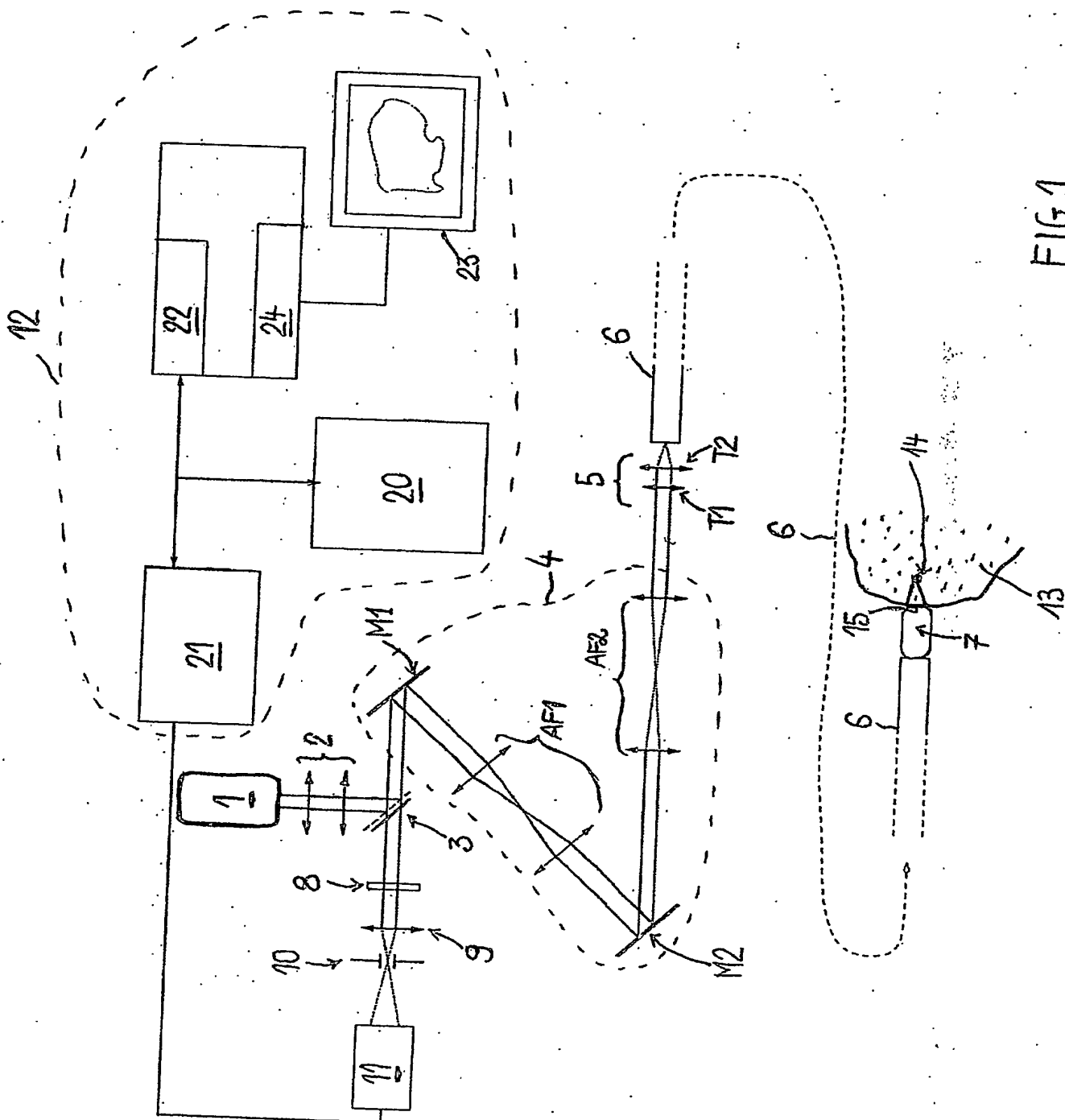
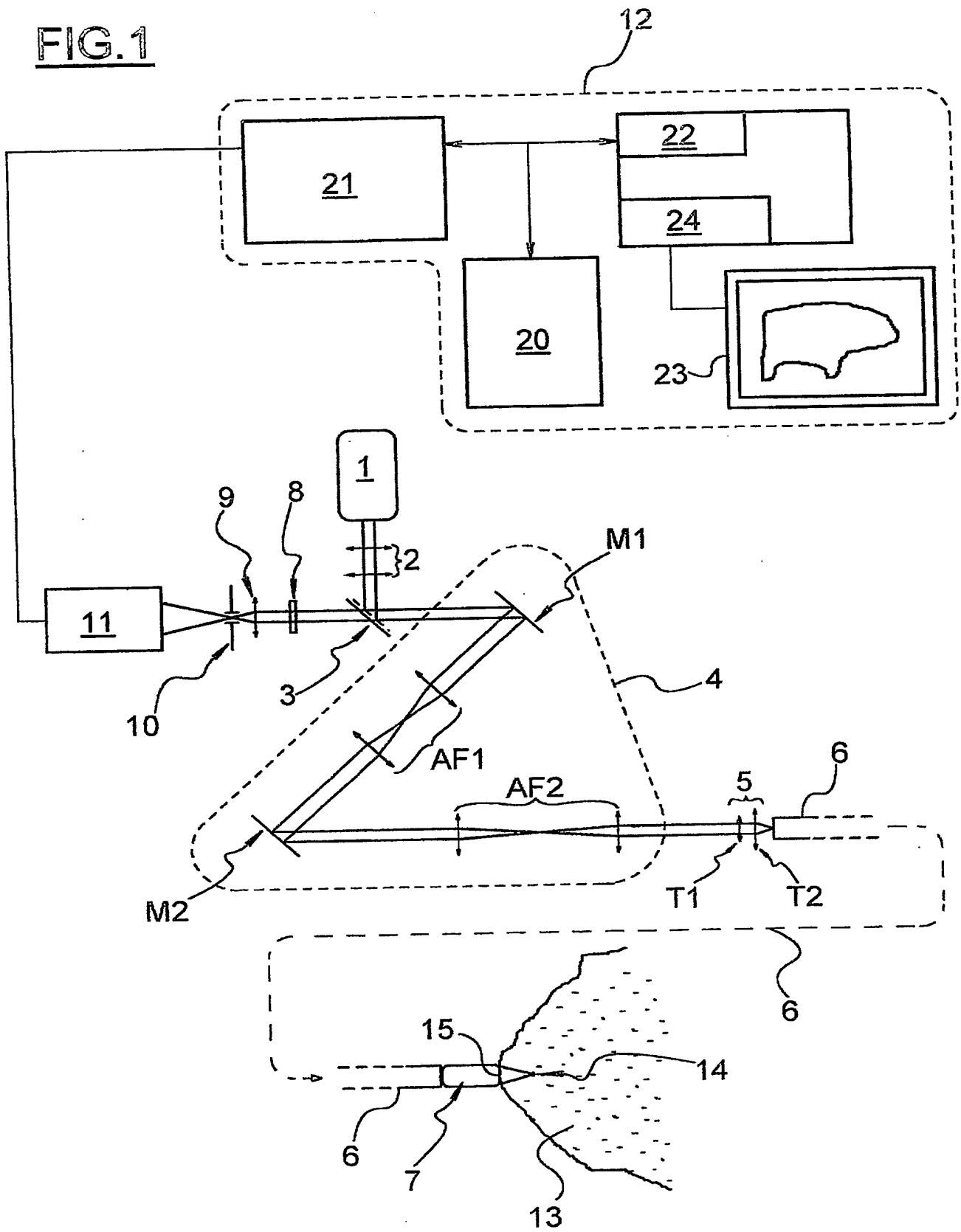


FIG. 1

FIG. 1



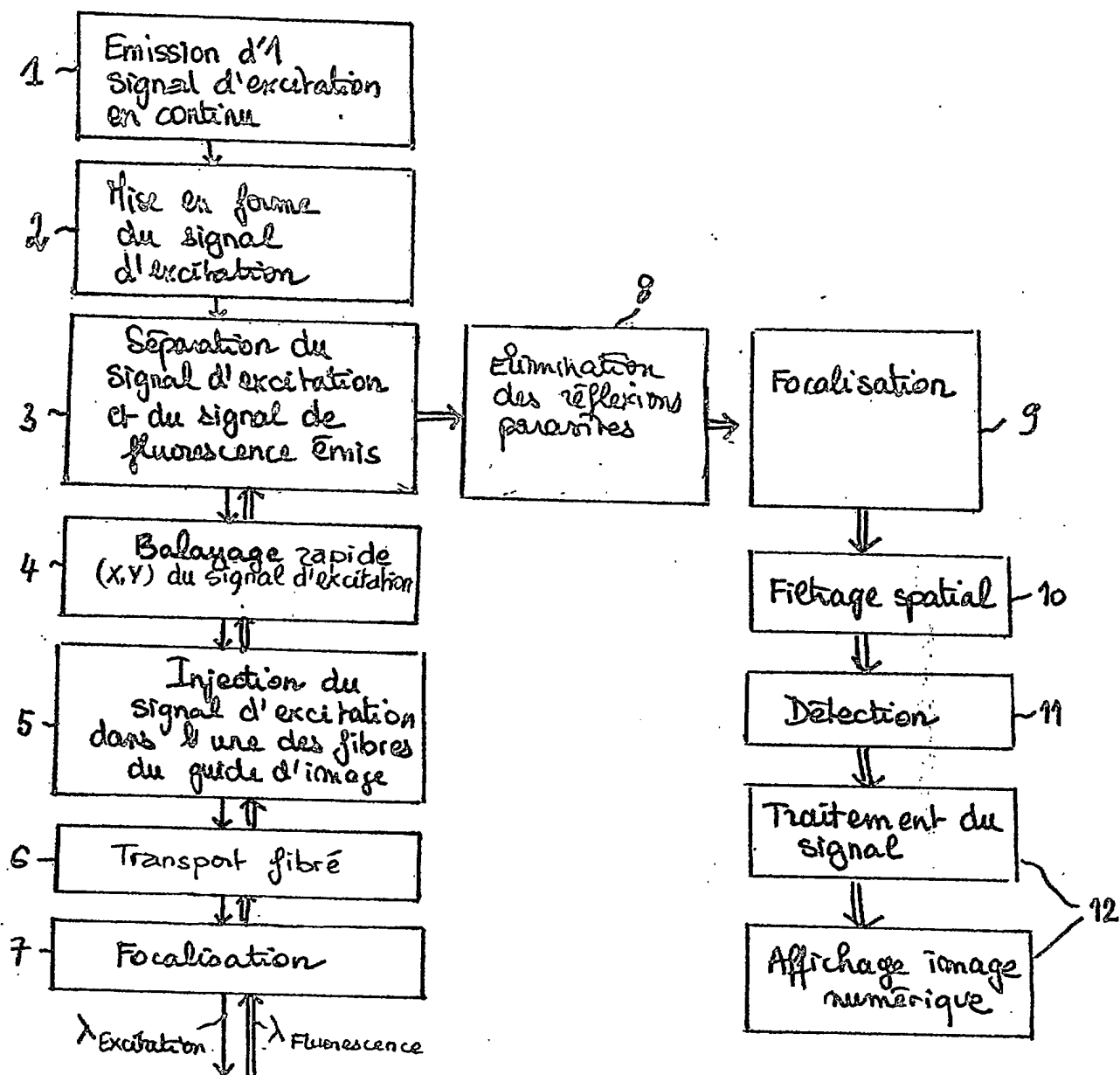
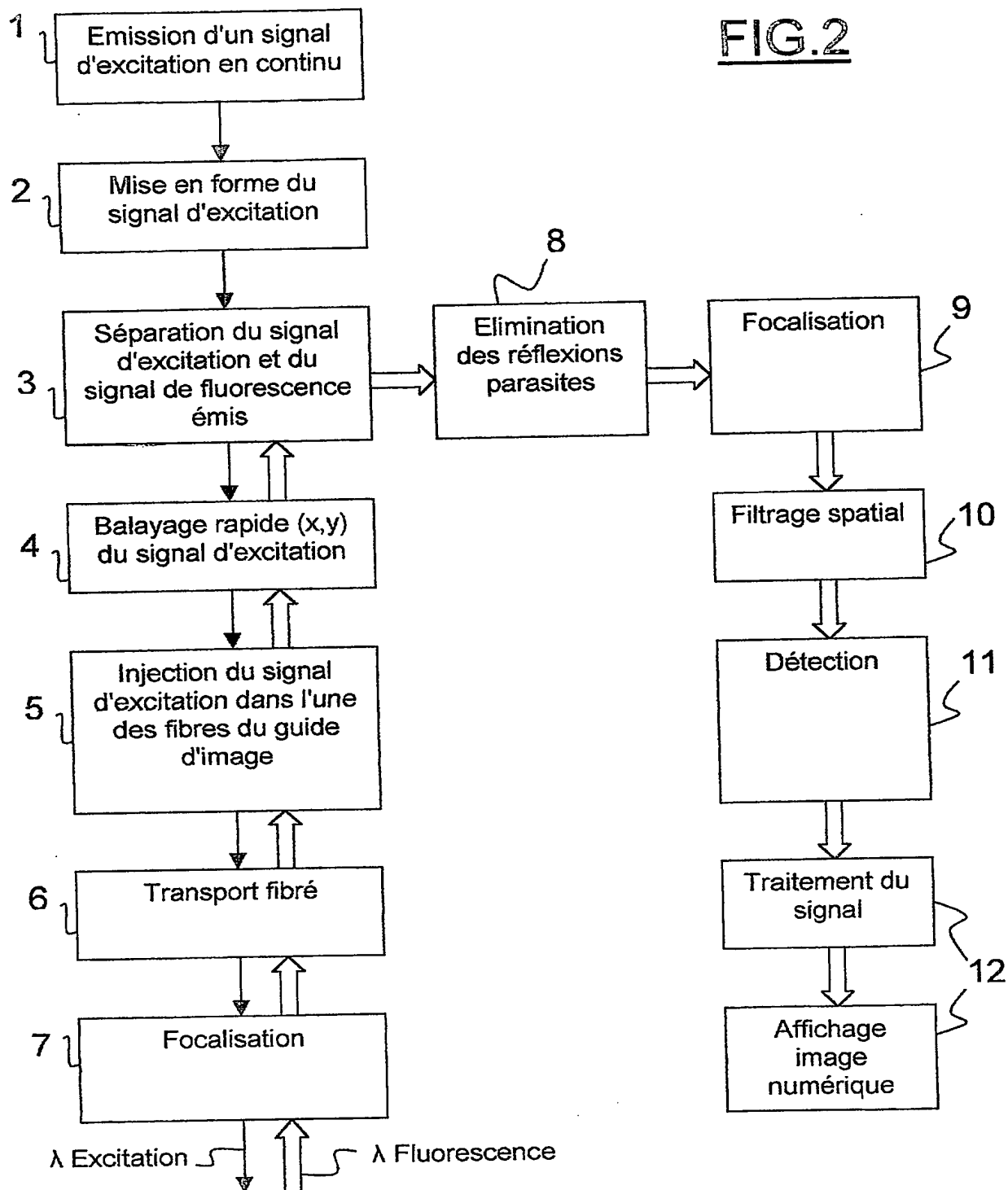
FIG 2

FIG.2

ÉPARTEMENT DES BREVETS

5 bis, rue de Saint Pétersbourg

5800 Paris Cedex 08

téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ...1/2

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)	IFBO2 MKT CVF
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0609099

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Procédé et appareillage d'imagerie de fluorescence
confocale fibrée.

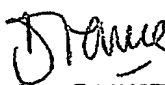
LE(S) DEMANDEUR(S) :

MAUNA KEA TECHNOLOGIES
9, rue d'Enghein
F-75010 PARIS
FRANCE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom		GENET	
Prénoms		Magalie	
Adresse	Rue	74, cours de Vincennes	
	Code postal et ville	75012	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		VIELLEROBE	
Prénoms		Bertrand	
Adresse	Rue	8, rue d'Estienne d'Orves	
	Code postal et ville	94300	VINCENNES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BERIER	
Prénoms		Frédéric	
Adresse	Rue	66, rue de Strasbourg	
	Code postal et ville	92400	COURBEVOIE
Société d'appartenance (facultatif)			

DATE ET SIGNATURE(S)
DU (DES) DEMANDEUR(S)
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)

Orsay, le 15 Juillet 2002

Isabelle de SAINT VIANCE
CPI 94 10 01



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .../... 2/2

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 2602

Vos références pour ce dossier (facultatif)		IFB02 MKT CVF	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0209099	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Procédé et appareillage d'imagerie de fluorescence confocale fibrée.			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
MAUNA KEA TECHNOLOGIES 9, rue d'Enghein F-75010 PARIS FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		CLADE	
Prénoms		Sophie	
Adresse	Rue	14, rue Perrichont	
	Code postal et ville	75016	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Orsay, le 15 Juillet 2002 Isabelle de SAINT VIANCE CPI 94 10 01	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.